فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۵، پاییز ۱۳۹۴، صفحه ۱۲۳- ۱۳۴
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۰۴

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های *استرپتومایسس* مولد آنزیم کیتیناز و بررسی آثار آنتاگونیستی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی

علیرضا دهناد *: استادیار بیوتکنولوژی میکروبی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران، dehnadar@yahoo.com
ابراهیم اسماعیلی: دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه زابل، ایران، ab.esmaili60@gmail.com
محمود سلوکی: دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، دانشگاه زابل، ایران، mahmood.solouki@gmail.com

چکیده

مقدمه: به منظور کاهش استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی در کنترل بیماری‌های گیاهی، رویکرد جایگزین کنترل بیماری‌ها به روش کنترل زیستی، مورد توجه قرار گرفته شده است. بیشتر اکتینومیست‌ها، به ویژه گونه‌های *Streptomyces*، عوامل کنترل زیستی با طیف گسترده در برابر پاتوژن‌های قارچی گیاهان هستند. هدف از انجام این پژوهش، استفاده از اکتینومیست‌های کیتینولایتیک جدا شده از خاک‌های استان آذربایجان‌شرقی برای تولید سموم زیستی است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خاک از مناطق مختلف استان آذربایجان‌شرقی تهیه شد. با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی گونه‌های *Streptomyces*، تک کلونی‌ها جداسازی شد. برای شناسایی مولکولی، ابتدا DNA باکتریایی استخراج و سپس، توالی *16S rDNA* آن‌ها تکثیر شد. با استفاده از آغازگرهای جهانی، جدایه‌های دارای ژن کیتیناز غربال‌گری شد. جدایه‌های مولد آنزیم کیتیناز با قارچ‌های پاتوژن جنس *آلترناریا* کشت آنتاگونیستی داده شد.

نتایج: از ۶۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده، ۳۱ جدایه باکتری *استرپتومایسس* جداسازی شد. از این تعداد، ۴ جدایه به گزینش جدایه‌های مولد آنزیم کیتیناز نتیجه مثبت نشان دادند. کشت آنتاگونیستی، ۳ جدایه منتخب باکتری با دو قارچ پاتوژن، نشان داد که جدایه AE09 دارای بیش‌ترین اثر ضد قارچی است.

بحث و نتیجه‌گیری: خاک‌های استان آذربایجان‌شرقی واجد باکتری‌های *استرپتومایسس* مولد ترکیبات ضدقارچی هستند. دست‌یابی به باکتری‌های *استرپتومایسس* دارای ژن کد کننده کیتیناز می‌تواند به شناسایی سویه‌های بسیار مؤثر برای دفاع ضد قارچی منجر باشد.

واژه‌های کلیدی: *استرپتومایسس*، ژن کیتیناز، *16S rDNA*، کنترل زیستی

* نویسنده مسؤول مکاتبات، دپارتمان بیوتکنولوژی، مرکز آموزش جهادکشاورزی استان آذربایجان شرقی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران

Copyright © 2015, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

اکتینومیست‌ها[1] حدود ۴۰ درصد از جمعیت باکتریایی خاک را تشکیل می‌دهند (۱ و ۲) و ویژگی‌هایی دارند که آن‌ها را برای عوامل بیوکنترل بر علیه قارچ‌های خاک‌زاد[2] بیمارگر گیاهی مفید می‌سازد این باکتری‌ها توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه مانند آنزیم‌ها و آنتی بیوتیک‌ها را دارند و احتمالا دارای آثار ضدقارچی هستند. همچنین، آن‌ها هدایت‌گرهای اصلی بافرهای زیستی خاک‌ها بوده و با تجزیه مواد آلی در تولید محصول نقش دارند (۳ و ۵). از جمله ویژگی‌های شاخص این باکتری‌ها که آن‌ها را برای کنترل برخی از عوامل خسارت‌زای گیاهی مناسب نموده است، ترشح آنزیم کیتیناز است؛ به گونه‌ای که این باکتری‌ها تجزیه کننده اصلی کیتین[3] و عامل اصلی برگرداندن این ماده سخت به چرخه طبیعت هستند (۶). کیتین یک پلی‌ساکارید[4] خطی بدون شاخه غیر محلول است که از واحدهای N استیل گلوکز آمین[5] تشکیل و از طریق پیوند $\beta(1\rightarrow4)$ به یکدیگر متصل شده‌است. کیتین ماده اصلی تشکیل دهنده دیواره سلولی قارچی است (۷).

گزارش‌های متعددی در ارتباط با اثر آنتاگونیستی اکتینومایست‌های جدا شده از خاک علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی منتشر شده است (۸ و ۹). اثبات شده است که بسیاری از اکتینومیست‌ها، به ویژه گونه‌های *استرپتومایسس*، عوامل کنترل زیستی وسیع الطیف در برابر پاتوژن‌های قارچی گیاهان هستند (۱۰). فعالیت آنتاگونیستی *استرپتومایسس‌ها* با قارچ‌های پاتوژن به طور معمول مربوط به تولید ترکیبات ضدقارچی و آنزیم‌های هیدرولیتیک است. به نظر می رسد که کیتیناز تولیدی باکتری‌های *استرپتومایسس*، آنزیم هیدرولیتیک مهمی در لیز دیواره سلولی قارچی است (۱۱).

کنترل زیستی به عنوان راهکار جایگزین سموم شیمیایی گوناگون برای کنترل بیماری‌های گیاهی توسعه یافته است. بر خلاف عوامل سنتتیک، موادی که به شکل میکروزیستی از گونه‌های مؤثر گرفته شده‌اند سمیت کمتر داشته، به راحتی قابل تجزیه بوده، و آلرژی زایی کمی دارند. این مواد در محصولات غذایی انباشته نمی‌شوند و نیز ارزان و مناسب برای مصرف در مقیاس صنعتی هستند. با استفاده از کنترل زیستی، خود میکروارگانیسم ها، می توانند با تولید آنتی‌بیوتیک و یا آنزیم‌های تجزیه کننده به طور مستقیم بر علیه بیماری های گیاهی گوناگون به کار روند (۱۲ و ۱۳). برای مثال، بر اساس رتبه‌بندی اداره کل مطالعات و بررسی‌های اقتصادی و اطلاعات برگرفته شده از اداره آمار و فن‌آوری سازمان جهاد کشاورزی، در سال زراعی ۸۹- ۹۰، استان آذربایجان‌شرقی رتبه ششم تولید سیب‌زمینی در کشور را دارد. همچنین، با توجه به گستردگی سطح زیر کشت سیب‌زمینی در سایر استان‌ها و وابسته بودن بشر از لحاظ تامین کربوهیدرات‌ها به این محصول، گسترش راهکارهایی برای مبارزه غیر شیمیایی با بیماری‌هایی که متوجه سیب زمینی و سایر گیاهان خانواده سولاناسه مانند گوجه فرنگی است، ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این بررسی، جداسازی و شناسایی گونه‌هایی از باکتری *استرپتومایسس* در خاک‌های استان آذربایجان شرقی است که برای کاهش عوارض ناشی از استفاده از کود و سموم شیمیایی با تولید آنزیم کیتیناز قابلیت بیوکنترلی داشته باشند(۳۰).

مواد و روش‌ها

در این پژوهش وسایل، مواد شیمیایی، بافرها و محیط‌های کشت به شرح ارایه شده در جدول ۱ استفاده شدند.

جدول ۱- فهرست مواد شیمیایی، وسایل، دستگاه‌ها

مواد شیمیایی	
مواد	شرکت سازنده
SDS	سیناژن
Tris base	سیناژن
Tris- HCl	سیناژن
Primer (F/R)	سیناژن
Master mix	سیناژن
Ethidium bromide	سیناژن
آب مقطر DNase free	سیناژن
EDTA	سیناژن
PVP	سیگما
Glucose	سیگما
Starch	سیگما
CTAB	مرک
DMSO	مرک
High Pure PCR Product Purification kit	مرک
Isoamyl alcohol	مرک
Chloroform	مرک
$CaCO_3$	مرک
$FeSO_4$	مرک
K_2HPO_4	مرک
KNO_3	مرک
$MgSO_4$	مرک
1kb DNA Ladder	فرمنتاز
Agar	لیوفیلم
Glycerol	باکر
Casein	کیمیا
Agarose	اینویتروژن
Isopropanol	دکتر مجللی
Nystatin	جابر بن حیان
NaCl	ارج
اتانول ۹۶ درصد	جهان الکل طب
آب مقطر	کسری
ازت مایع	-

وسایل و دستگاه‌ها	
نام دستگاه‌ها	شرکت سازنده- کشور
هود لامینار (JLB VI2Ors)	ژال ایران
هود شیمیایی (VWR 105)	فرپژوه ایران
ورتکس میکسر (S0100-230V)	لابنت ایران
بن‌ماری (1092)	فاطر ایران
هیتر استریر (MR 3003)	هایدولف آلمان[۶]
ترمال سایکلر (M)	بیوسیستم آمریکا
میکرو سانتریفیوژ یخچال‌دار (VS-15000 CFNII)	ویژن کره[۷]
ترازوی دو صفر (GP5202)	سارتریوس آلمان
ترازوی چهار صفر (CP324S)	سارتریوس آلمان[۸]
شیکرانکوباتور (3527-6)	سهندیران
انکوباتور رومیزی (B34)	بندر آلمان[۹]
ژل داک (BioDocAnalyze)	بیومترا آلمان[۱۰]
اسیدتیه سنج (1. 691. 0020)	متروم سوییس[۱۱]
اتوکلاو (SX-300E)	تومی ژاپن[۱۲]
الکتروفورز افقی	اختریان
فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد	ویژن کره
فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد	فیلور- ایران
یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد	فیلور- ایران

در این بررسی نمونه‌های خاک از استان آذربایجان‌شرقی و از عمق ۱۰ تا ۲۰ سانتی‌متری جمع‌آوری شد. نمونه‌ها بر حسب موقعیت مکانی کدگزاری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. از نمونه های خاک، رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2} به شکل سری تهیه و هم‌زمان اسیدیته تمامی نمونه‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد (۱۴). با کشت ۵۰ مایکرو لیتر از رقت دوم در محیط کشت استارچ کازئین آگار[۱۳](S. C. A) (جدول ۲)، تک کلونی‌های *استرپتومایسس* بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی خاص کلونی‌شان (شامل: ظاهری خشک و گچی، سفید یا رنگی، چسبیده به محیط و دارای میسلسوم های رویشی) از محیط کشت جداسازی شد (۱۵). برای تهیه استوک باکتریایی به منظور نگهداری طولانی مدت جدایه‌ها برای مطالعات بعدی، یک تک

کلون از هر جدایه باکتری‌های *استرپتوما یسس* به محیط کشت مایع ISP2[۱۴] (جدول ۲)، انتقال داده و پس از ورتکس به همراه گلیسرول در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۶).

جدول ۲- اجزا و مقادیر بافر استخراج DNA و محیط کشت

بافر DNAگرم/ لیتر استخراج	(ISP2)گرم/ لیتر	(SCA)گرم/ لیتر
Tris-base:۱۲/۱	Malt extract: ۱۰	Starch: ۱۰
EDTA-Na_2: ۷/۴۴	Yeast extract: ۱۰	Casein: ۰/۳
PVP $_{(\%2)}$: ۱	$CaCO_3$: ۲	$CaCO_3$: ۰/۰۲
NaCl: ۸/۱۸۲	اسیدیته: ۷/۳	$FeSO_4$: ۰/۰۱
اسیدیته: ۸		K_2HPO_4:۲
		KNO_3: ۲
		$MgSO_4$: ۰/۰۵
		NaCl: ۲
		Agar: ۱۵
		Nystatin:۰/۰۲
		DMSO: ۱ میلی‌لیتر
		اسیدیته: ۷/۲

استخراج DNA ژنومی باکتریایی: با توجه به این نکته که دیواره پپتیدوگلیکانی باکتری *استرپتوما یسس* بسیار سخت و مقاوم است، روش‌های متداول لیز سلولی برای از بین بردن و لیز کردن آن کافی نیست. بنابراین، به کمک اعمال شوک حرارتی شدید یعنی با استفاده از انجماد و ذوب متناوب، ابتدا دیواره پپتیدوگلیکانی[۱۵] باکتری شکسته شده و سپس، بقیه مراحل استخراج بر اساس روش یاد شده در بالا انجام گرفت.

برای استخراج DNA ژنومیک جدایه‌های باکتری *استرپتوما یسس*، ابتدا نمونه‌های باکتریایی بر روی محیط استارچ کازئین آگار (S. C. A) کشت و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، باکتری‌ها از روی پلیت‌ها برداشته و به یک میکروتیوب حاوی ۳۰۰ مایکرو لیتر بافر لیزکننده (۱۷) (جدول ۲)، منتقل شد. میکروتیوب‌ها ابتدا داخل ازت مایع قرار گرفته و بلافاصله به بن ماری ۶۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و سپس ورتکس شدند (این عملیات ۷ بار تکرار شد). پس از افزودن ۲۰۰ مایکرو لیتر دیگر از بافر لیز کننده، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با g ۱۲۶/۵۸ سانتریفیوژ شدند. سپس، مایع رویی برداشته شده و هم حجم آن محلول کلروفرم- ایزوامیل[۱۶] الکل (به نسبت ۱:۲۴) افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه با g ۶/۷۴ سانتریفیوژ شدند. دوباره مایع رویی برداشته شده، هم حجم آن ایزوپروپانول[۱۷] سرد افزوده و به مدت ۸ ساعت در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته، محتویات درون تیوب با ۱۰۰ مایکرو لیتر الکل ۷۰ درصد شستشو داده و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته، ۱۰۰ مایکرو لیتر آب مقطر به ویال‌ها اضافه و در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت DNA استخراجی، از طریق مقایسه با سایز مارکر بر روی ژل آگاروز تخمین زده شد (۱۷).

تکثیر قطعه *16S rDNA*: برای تایید شناسایی جنس *استرپتوما یسس* از طریق روش‌های ریخت‌شناسی، توالی *16S rDNA* تمامی جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای جهانی AF, AR تکثیر شد (جدول ۳) (۱۸).

واکنش PCR شامل مخلوط (Dionized H_2: ۵۰ میکرو لیتر، Master Mix: ۲۵ میکرو لیتر، PR: ۲ میکرولیتر، PF: ۲ میکرو لیتر، DNA Template: ۱ میکرو لیتر)، طبق برنامه دمایی جدول ۴، انجام شد. سپس، محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد.

غربال‌گری جدایه‌های مولد ترکیبات ضدقارچی (آنزیم کیتیناز): برای تکثیر ژن رمزگردان آنزیم کیتیناز خانواده ۱۹ و غربال جدایه‌های مولد این نوع آنزیم، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای ژنوم تمامی جدایه‌های مورد آزمایش انجام گرفت. برای تکثیر قطعه مربوط به ژن رمزگردان آنزیم کیتیناز خانواده ۱۹، از آغازگرهای به کار برده شده توسط هاستر[۱۸] و همکارانش در سال ۲۰۰۵ استفاده شد، که طراحی آن‌ها بر اساس تکثیر یک قطعه bp ۸۸۵ از ژن کیتیناز خانواده ۱۹ بوده است (۱۹). ویژگی‌های آغازگرهای رفت CH19F (Forward Primer) و برگشت CH19R (Complementary Primer & Reverse Primer) به شرح جدول ۵ است. توالی آغازگر همولوگوس دقیقاً همان توالی ژنومیک است و نقطه ابتدایی قطعه تکثیر شده را مشخص می‌کند و توالی آغازگر برگشت نوکلئوتیدهای انتهایی قطعه مورد تکثیر است.

برای تکثیر ژن کیتیناز، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر (Master Mix: ۷ میکرو لیتر، PR: ۵/. میکرو لیتر، PF: ۵/. میکرو لیتر، DNA Template: ۱ میکرولیتر) طبق برنامه دمایی جدول ۶ انجام شد.

جدول ۳- آغازگرهای جهانی تکثیر قطعه *16S rDNA*

F/R	توای آغازگر	طول محصول حاصل پس از PCR
AF	5′- AGA GTT TGA TCC TGG CTC A - 3′	bp ۱۵۰۰
AR	5′- AAG GAG GTG ATC CAG CCG C - 3′	bp ۱۵۰۰

جدول ۴- برنامه دمایی واکنش PCR برای تکثیر ژن 16S rDNA

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشت	۹۵	۱ دقیقه	۴۰
اتصال	۵۶	۱ دقیقه	
تکثیر	۷۲	۹۰ ثانیه	
تکثیر نهایی	۷۲	۱۵ دقیقه	۱

جدول ۵- آغازگرهای جهانی تکثیر ژن کیتیناز

F/R	توای آغازگر	طول محصول حاصل پس از PCR
CH19F	5′- ACG TGT ATC GAC GTG TCA TGA GT- 3′	۸۸۵ bp
CH19R	5′- TAC GAC ATC AGC AGC TCA GGT TC- 3′	۸۸۵ bp

جدول ۶- برنامه دمایی واکنش PCR برای تکثیر ژن کیتیناز

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	۹۶	۵ دقیقه	۱
واسرشت	۹۶	۱ دقیقه	۳۵
اتصال	۵۴	۱ دقیقه	
تکثیر	۷۲	۱ دقیقه	
تکثیر نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

برای آشکارسازی محصولات PCR، نمونه‌ها به مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت در بافر (Loading Buffer) 6X با ولتاژ ۸۵ تا ۱۰۰ میلی‌ولت بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شدند. سپس، به مدت ۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید[۱۹] رنگ‌آمیزی و باندهای مربوطه در زیر نور UV (دستگاه ژل داک)، مشاهده شد. جدایه‌هایی که ژن کیتیناز در آن‌ها تکثیر شد، در پلیت‌های حاوی محیط کشت اختصاصی باکتری‌ها (NA) برای بررسی آثار آنتاگونیستی ذخیره شدند.

ارزیابی میزان قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های مولد آنزیم کیتیناز: به منظور تعیین توانایی آنتاگونیستی باکتری‌های جداسازی شده در تولید مواد ضدقارچی، ۵ جدایه از جدایه‌های مولد آنزیم کیتیناز با دو جدایه قارچ بیماری‌زا گیاهی (*آلترناریا آلترناتا*[۲۰]، *آلترناریا سولانی*[۲۱]) کشت متقابل داده شد. آزمون آنتی‌بیوگرام[۲۲] به روش کشت متقابل[۲۳] انجام و بر اساس قطر ناحیه بازدارنده رشد[۲۴]، فعال‌ترین جدایه انتخاب شد.

۱- جدا سازی عامل بیماری: به منظور تهیه و جداسازی عامل بیماری، از مزارع آلوده سیب زمینی و گوجه فرنگی اطرف شهر تبریز نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها به طور جداگانه در پاکت‌های کاغذی قرار داده و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. با استفاده از اسکالپل استریل قطعات کوچکی به اندازه ۱ سانتی‌متر از بافت‌های آلوده بریده شد. قطعات بریده شده به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم[۲۵] ۱۰ درصد ضدعفونی سطحی شده و بلافاصله دو بار با آب شستشو شد. نمونه‌ها پس از آب‌گیری با کاغذ صافی بر روی محیط مغذی (سیب‌زمینی دکستروز آگار)PDA[۲۶] کشت داده شد. سپس، پلیت‌ها به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از کلونی‌های رشد یافته‌ایی که دارای ویژگی‌های *آلترناریا* بودند با برداشتن تک هاگ یا زنجیره هاگ خالص شدند. قطعاتی به اندازه ۵ میلی‌متر از کلونی‌های درحال رشد برداشته شده و بر روی محیط غذایی (سیب زمینی هویج آگار)[۲۷] PCA کشت داده شد. برای تحریک الگوی هاگ‌زایی، پلیت‌ها در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد با چرخه نوری ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی به مدت ۵ تا ۷ روز انکوبه شدند. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از کلید قوستا[۲۸] و همکاران (الگوهای کلی هاگ‌زایی شامل آرایش هاگ‌ها رو هاگ‌بر، تعداد هاگ‌ها در هر زنجیره و الگوی انشعاب یافتن زنجیره‌ها هستند) انجام شد و آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها به اثبات رسید (۲۰).

۲-آزمون هاله بازدارندگی: برای بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های *Streptomyces* علیه قارچ‌های بیمارگر یاید شده از روش کشت متقابل بر روی محیط کشت PDA استفاده شد. بدین صورت که ابتدا از هر کدام از جدایه‌های باکتری مقطعی به قطر ۵ میلی‌متر برداشته و در یک سمت پلیت حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. باکتری‌های کشت داده شده به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از این مدت، از هر کدام از قارچ‌های *آلترناریا سولانی* و *آلترناریا آلترناتا* یک بلوک میسلیوم چهار روزه به قطر ۵ میلی‌متر برداشته شده و در مقابل هر جدایه باکتری کشت شده در پلیت ها قرار داده شد (شکل ۴).این عمل در ۵ تکرار برای هر کشت آنتاگونیستی انجام گرفت. به طور هم‌زمان ۵ نمونه از هر کدام از جدایه‌های قارچ نیز به عنوان شاهد در محیط مغذی PDA کشت داده شد. کشت‌های انجام

گرفته شده به مدت ۲۰ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از سپری شدن مدت یاد شده، میانگین شعاع هاله‌های ایجاد شده در اطراف هر باکتری آنتاگونیست با استفاده از کولیس اندازه گیری و ثبت شد.

نتایج

نمونه‌برداری و جداسازی اکتینومایست‌ها: از مناطق مختلف استان آذربایجان‌شرقی ۶۰ نمونه خاک جمع‌آوری شد و طبق روش گفته شده در بخش مواد و روش‌ها در مجموع ۳۱ جدایه *استرپتومایسس* جداسازی شد (شکل ۱) (۲۱).

شکل۱- نمای ریخت‌شناسی کلونی تعدادی از جدایه‌های جداسازی شده

تکثیر قطعه 16S rDNA جدایه‌ها: تعداد ۳۱ ایزوله، از ۶۰ نمونه خاک، به تکثیر قطعه *16S rDNA* پاسخ مثبت دادند (شکل ۲).

تکثیر ژن آنزیم کیتیناز: ژن آنزیم کیتیناز خانواده ۱۹، بر اساس برنامه یاد شده در جدول ۶ تکثیر شد. نتیجه این واکنش نشان داد که از ۳۱ جدایه مورد آزمایش، تنها ۴ جدایه دارای این ژن بودند که اندازه قطعه تکثیری در تمامی آن‌ها در محدوده بین ۷۵۰ تا ۱۰۰۰ bp بود (شکل ۳).

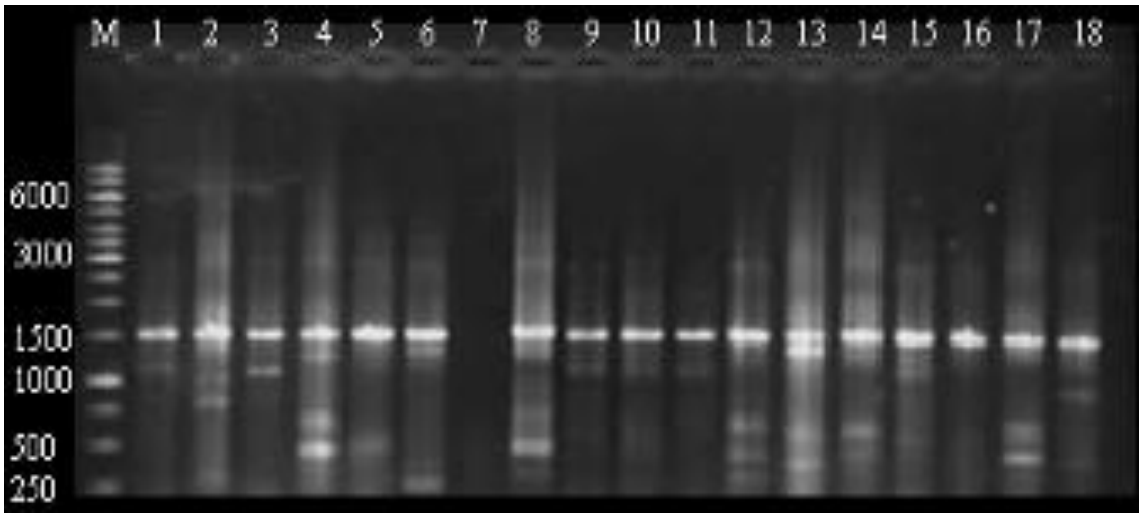
ارزیابی میزان قدرت آنتاگونیستی جدایه‌ها و تعیین جدایه فعال: در این بررسی ۳ جدایه از جدایه‌های مولد آنزیم کیتیناز با دو جدایه قارچ بیماری‌زا گیاهی (*آلترناریا آلترناتا* و *آلترناریا سولانی*) کشت متقابل داده شد. پس از ۲۰ روز انکوباسیون تمامی جدایه‌های *استرپتومایسس* توانستند رشد میسلیوم قارچی را مهار و در اطرافشان هاله عدم رشد قارچ ایجاد کنند. این در حالی است که کشت‌های شاهد قارچ توانستند در طی این مدت تمامی قطر پلیت را پر کنند.

نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی نشان می‌دهد که اختلاف معناداری بین صفات اصلی وجود نداشته است و بنابراین به تجزیه و تحلیل آن‌ها پرداخته نشده است. اما بین آثار متقابل اختلاف معناداری وجود داشته وطبق نمودار زیر بررسی شده است (جدول ۷).

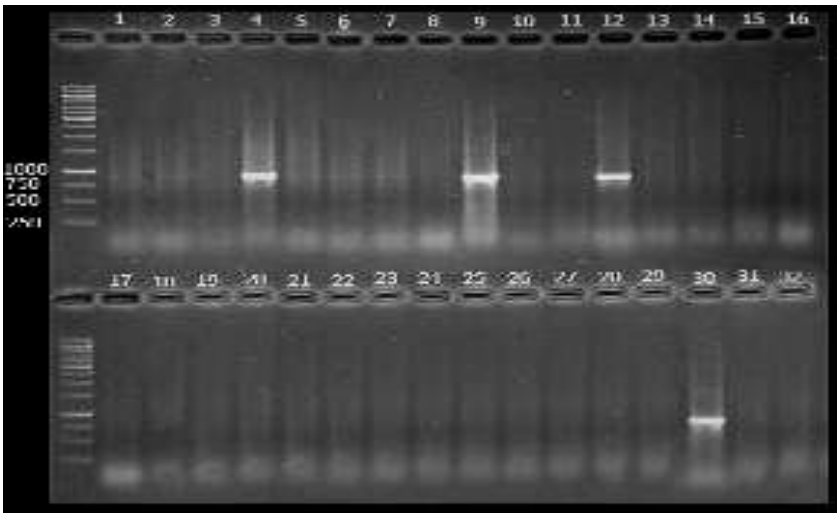
جدول ۷- نتایج تجزیه واریانس تیمارهای باکتری و قارچ بر شعاع هاله عدم رشد

منابع تغییر	درجات آزادی	میانگین مربعات
باکتری	۲	۰/۰۴۲۳^{ns}
قارچ	۱	۰/۰۳۳۳^{ns}
باکتری×قارچ	۲	۰/۰۸۰۳*
خطا	۲۴	۰/۰۱۵۷
ضریب تغییرات (درصد)		۱۳/۷۰
ضریب تبیین (درصد)		۴۲/۵۷

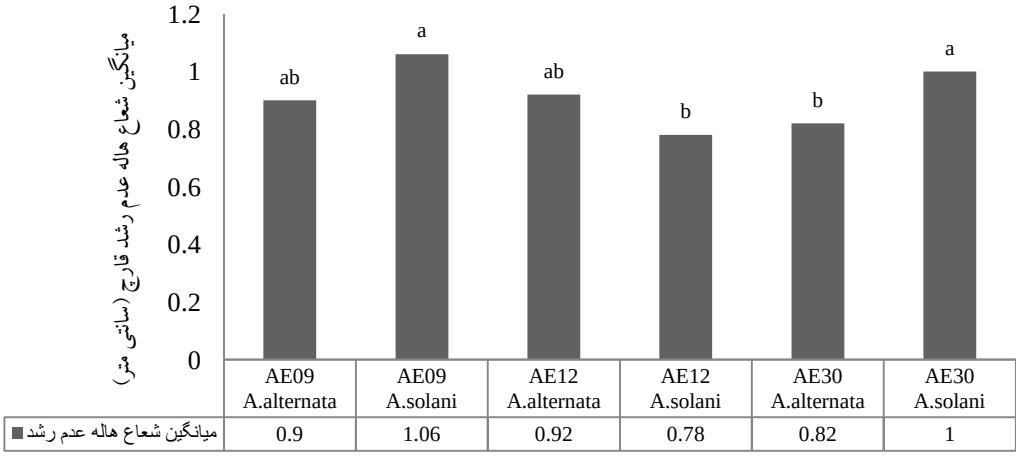
ns، ** و * به ترتیب غیر معنادار و معنادار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد هستند.



شکل ۲- نتایج PCR مربوط به تکثیر قطعه *16S rDNA* به طول ۱۵۰۰ bp با جفت آغازگرهای *AF/AR*



شکل ۳- نتایج PCR مربوط به تکثیر قطعه 885 bp



شکل ۴- میانگین آثار اصلی شعاع هاله عدم رشد قارچ‌های *آلترناریا* توسط باکتری‌های *استرپتومایسس*

حروف در نمودار بیانگر اختلاف معنادار میانگین تیمارها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد است.

در مجموع جدایه‌های *Streptomyces* توانستند قارچ *آلترناریا آلترناتا* را بهتر از *آلترناریا سولانی* کنترل کنند. در بین جدایه‌های *استرپتومایسس* بیش‌ترین میزان ایجاد هاله بازدارندگی بر روی قارچ *آلترناریا آلترناتا* را، جدایه AE12 با ۰/۹۲ سانتی‌متر شعاع هاله ثبت کرده (a_2b_1) و پس از آن به ترتیب جدایه‌های AE09 و AE30 قرار داشتند. بیش‌ترین میزان ایجاد هاله بازدارندگی بر روی قارچ *آلترناریا سولانی* را، جدایه AE09 با ۱/۰۶ سانتی‌متر ثبت کرد (a_1b_2) و پس از آن به ترتیب جدایه‌های AE30 و AE12 قرار داشتند. بیش‌ترین میزان مهارکنندگی بر روی رشد هردو قارچ *آلترناریا سولانی* و *آلترناریا آلترناتا* توسط جدایه AE9 به میزان ۰/۹۸ سانتی متر ایجاد شد و پس از آن به ترتیب جدایه‌های AE30 و AE12 قرار داشتند. ، جدایه AE9 به عنوان مؤثرترین باکتری *Streptomyces* در کنترل رشد قارچ *آلترناریا* تشخیص داده شد.

بحث و نتیجه‌گیری

دامنه اسیدیته نمونه‌های خاک مورد آزمایش در این بررسی بین ۷/۷ تا ۹ بوده است. دانشمندان دریافته‌اند که باکتری های *Streptomyces* به طور معمول اسیدیته‌های قلیایی و خنثی را برای رشد ترجیح می‌دهند (۲۲). باتوجه به ویژگی‌های ظاهری تک کلونی‌های رشد یافته در محیط کشت، ۳۱ جدایه باکتری *Streptomyces* جداسازی شد. این باکتری ها دارای شکل‌های مختلف با خواص ریخت‌شناسی متفاوت هستند. در ضمن بر اساس رنگدانه (پیگمنت) پشت کلونی نیز امکان جداسازی نمونه‌ها وجود دارد. بنابراین، باکتری‌های *Streptomyces*، بر اساس ریخت‌شناسی خاص کلونی‌شان از محیط کشت جداسازی شدند (۲۳).

تکثیر توالی *16S rDNA* توسط آغازگرهای جهانی اثبات کرد که جدایه‌های جداسازی شده به جنس *Streptomyces* تعلق دارند. *استرپتومایسس‌ها* بیشتر باتوجه به معیارهای ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی شناسایی می‌شوند، و در نتیجه ترتیب گونه‌ها به شکل گروه‌های خوشه‌ای هستند و بر اساس رشته‌های هوایی (اسپوروفورز) و بستر قارچ، رشد زنجیره اسپور مارپیچی و سطح صاف اسپور استرین، آن‌ها تحت جنس *استرپتومایسس* قرار می‌گیرند. این هویت تاکسونومی مسلم و قطعی نیست، اما شاخص‌های مختلف فیزیکی-شیمیایی و شناسایی توالی *16S rDNA* روش مطمئنی بوده و می‌توان جدایه را به عنوان جنس *Streptomyces* تعیین کرد. علاوه بر این، مطالعه ویژگی‌های رشد در مواد محیط کشت مغذی تا حد زیادی بر رشد و ریخت‌شناسی موجودات زنده تاثیر می‌گذارد (۲۴). با تکثیر ژن رمزگردان آنزیم کیتیناز خانواده ۱۹ مشخص شد که تنها ۴ جدایه از ۳۱ جدایه باکتری *Streptomyces* جداسازی شده دارای این ژن هستند. این نتیجه نشان دهنده کمیاب بودن ژن کیتیناز خانواده ۱۹ در بین باکتری‌های *استرپتومایسس* است. اگر چه درصد نمونه‌های آنتاگونیست غربال‌گری شده کم است، اما این نتایج در مقایسه با مطالعات انجام شده قبلی، از این فرضیه که جدایه‌های *Streptomyces* چند اثر بوده و نویدی برای کاربرد در بسیاری از فرآیندهای بیوتکنولوژی، از جمله بیوکنترل پاتوژن‌های قارچی خاک‌زاد هستند، حمایت می‌کند (۲۵).

آنزیم کیتیناز یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه تولیدی باکتری های *استرپتومایسس* است. زیرا این آنزیم با تجزیه کیتین دیواره سلولی قارچ‌ها، به نوعی یک فعالیت ضدقارچی را برای باکتری‌های *استرپتومایسس*

ایجاد می کند. کیتینازهای باکتری‌های *استرپتومایسس* در دو خانواده ۱۸ و ۱۹ گلیکوزیل هیدرولازها طبقه بندی می‌شوند. در این میان کیتینازهای خانواده ۱۹ مشابه کیتینازهای گیاهی بوده و فعالیت ضدقارچی در خور توجهی را نشان می‌دهند (۱۸ و ۲۶).

در بررسی آثار آنتاگونیستی، تمامی جدایه‌های باکتری *Streptomyces* مورد آزمایش توانستند از رشد هر دو قارچ پاتوژن گیاهی *آلترناریا آلترناتا* و *آلترناریا سولانی* ممانعت کنند، اما قادر به از بین بردن کامل آن نشدند. این در حالی بود که کشت‌های شاهد قارچ توانستند در طی این مدت تمامی قطر پلیت را پر کنند. فعالیت آنتاگونیستی میکروارگانیسم‌های بیوکنترلی، بیشتر با مهار رشد قارچ و یا کاهش علایم آلودگی بوته‌هاست (۱۱).

از آن جا که بلوک‌های قارچ‌های بیمارگر *آلترناریا سولانی* و *آلترناریا آلترناتای* برداشته شده از حاشیه پرگنه ها در ناحیهٔ بازدارندگی آزمون کشت متقابل در محیط تازه دوباره احیا و رشد کردند، مشخص شد که متابولیت‌های ترشح شده در محیط کشت جامد روی قارچ‌های یاد شده اثر بازدارندگی و نه کشندگی دارند. در بررسی آثار آنتاگونیستی ۲۳ جدایه باکتری بر علیه *آلترناریا سلولانی* عامل بلالت زودرس در گوجه فرنگی در محیط اینویترو به روش دوئل کالچر و در حالت گلخانه ای توسط یازی جی[۲۹] و همکاران در سال ۲۰۱۱ بیان شد که در ارزیابی اینویترو تمامی ۲۳ جدایه بر روی میسلیوم‌های قارچی اثر کنترلی داشتند (۲۷ و ۲۸).

در سال‌های قبل، تعدد ژن کیتیناز بر روی ژنوم باکتری‌های *Streptomyces*، توسط پژوهشگران به اثبات رسیده بود؛ اما تعداد کمی از ژن‌های مورد آزمایش، به کیتینازهای خانواده ۱۹ که فعالیت ضد قارچی بالایی دارند، متعلق بودند. در کل کیتینازهای خانواده ۱۹ در ارگانیسم‌های پروکاریوتیک کمابیش کمیابند (۲۶ و ۲۹). بنابراین، دست‌یابی به باکتری‌های *Streptomyces* دارای ژن رمزگردان کیتیناز خانواده ۱۹ می‌تواند به شناسایی سویه‌های بسیار مؤثر برای دفاع ضد قارچی منجر شود. در نتیجه خاک‌های استان آذربایجان‌شرقی مستعد وجود گونه‌هایی از باکتری‌های *Streptomyces* هستند که توانایی کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی را دارند و دارای پتانسیل بالقوه‌ای برای معرفی و استفاده به عنوان سم زیستی هستند. همچنین، این نتایج نشان می‌دهد که *Streptomyces AE09* می‌تواند به عنوان یک عامل بالقوه بیوکنترلی برای توسعه آفت‌کش‌های زیستی با طیف گسترده‌ای باشد. شناسایی باکتری‌های مولد آنزیم کیتیناز برای نخستین بار در منطقه آذربایجان بررسی شده است و می‌توان از آن برای جایگزینی سموم و کودهای شیمیایی بهره گرفت.

تشکر و قدردانی

از پژوهشکده بیوتکنولوزی کشاورزی ایران وزارت جهاد کشاورزی و مرکز آموزش جهاد کشاورزی استان آذربایجان شرقی برای حمایت‌های مالی و تبادل اطلاعات علمی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

(1) Atlas RM., Bartha R. *Microbial ecology (Fundamentals and application).* 2nd edition. Menlo park, CA: Benjamin/Cummings publishing company; 1987.

(2) David A. *Streptomyces in nature and medicine the antibiotic makers*. New York: Oxford University Press; 2007.

(3) Brown ME. *Seed and root bacterization.* Palo Alto., CA: Annual review of phytopathology; 1974; 12: 181- 97.

(4) Hanan H., Mohamed H., Virrol M., Yedir O. Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World jornal of Microbiol Biotechnoogyl* 2008; 24 (11): 2565- 75.

(5) Shimizu M., Nakagawa Y., Sato Y., Furumai T., Igaroshi Y., Onaka H., et al. Studies on endophytic Actinomycetes (I) *Streptomyces* sp. isolated from rododendron and its antifungal activity. *General Plant Pathology* 2000; 66 (4): 360- 6.

(6) Deshpande M. Enzymatic degradation of chitin and its biological applications. *Journal of Scientific & Industrial Research* 1986; 45 (6): 273- 81.

(7) Aslak E. Characterisation of chitin and a study of its acid-catalysed hydrolysis [Dissertation]. Norwey: Science and Technology Univ; 2007.

(8) Crawford DL., Lynch JM., Whipps JM., Ousley MA. Isolation and characterization of Actinomycete Antagonists of a fungal root pathogen. *Appllied Environmental Microbiology* 1993; 59 (11): 3899- 905.

(9) Youssefi YA., El-Tarabily KA., Husseini AM. Plectosporium tabacinum root rot disease of white lupine (lupinus termis forsk.) and its biological control by *Streptomyces* species. *Journal of Phytopathology* 2001; 149 (1): 29- 33.

(10) Gil JJ. Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnology Letters* 2005; 27 (19): 1483- 6.

(11) Nguyen XH., Naing KW., Lee YS., Tindwa HG., Lee H., Jeong BK., et al. Biocontrol potential of *Streptomyces griseus H7602* against root rot disease (phytophthora capsici) in pepper. *Plant Pathol* 2012; 28 (3): 282- 9.

(12) Agrios GN. *Plant Pathology*. (3 rd Edition). San Diego., CA: Academic Press; 1988.

(13) Chater KF., Wilde LC. Restriction of a bacteriophage of *Streptomyces* albus G involving endonuclease SalI. *journal of Bacteriology* 1976; 128(2): 644- 50.

(14) Dhanasekaran D., Rajakumar G., Sivamani P., Selvamani S., Panneerselvam A., Thajuddin N. Screening of salt pans *actinomycetes* for antibacterial agents. *The Internet Journal of Microbiology* 2005; 1 (2): 1- 6.

(15) Khayat maher R., Amoozegar MA., Seyyedmahdi SH., Hamedi J., Naghavi MR., et al. Isolation and screening of phytotoxin producing actinomycetes and determination of phytotoxin effect spectrum of selected strains. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (2): 1- 22.

(16) Shirling EB., Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1966; 16(3): 313- 40.

(17) Khadivi F. Dehnad AR. Potential of gold nanoparticles obtained by Actinomistalls Maku soil and hot springs of Ardabil (above 40 °C) [Dissertation]. Zanjan: Islamic Azad university of Zanjan Univ.; 2009.

(18) Prapagdee B., Kuekulvong C., Mongkolsuk S. Antifungal Potential of Extracellular Metabolites Produced by *Streptomyces hyroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Biological Sciences* 2008; 4 (5): 330- 7.

(19) Hoster F., Schmitz JE., Daniel R. Enrichment of chitinolytic microorganisms: Isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Microbiol Biotechnol* 2005; 66 (4): 434- 42.

(20) Ghosta Y., Ershad D., Zare R., Mohammadi Goltape E. Taxonomic study

on *Alternaria* species in Iran(2). *Rostaniha* 2003; 4 (3-4): 105- 21. (in Persian).

(21) Kong LR., Tzeng Dean D., Yang CH. Generation of PCR-based DNA fragments for specific detection of *Streptomyces saraceticus N45*, Proceedings of the National Science Council, *(B)* 2001; 25 (2): 119- 27.

(22) Locci R. *Streptmyces and related genera in: Bergeys manual of Systematic Bacteriology* 1998; 4: 2451- 508.

(23) Mousavi SM., Ghanbarvand F., Dehnad A. Growth inhibitory and differentiating effects of ethyl acetate soluble metabolite of Iranian native bacteria, *Streptomyces calvus*, in human myeloid leukemia K562 cell line. *Medical Science Journal of Islamic Azad Univesity Tehran Medical Branch* 2012; 22 (3): 175- 83.

(24) Sowndhararajan K., Kang SC. In vitro antagonistic potential of *Streptomyces sp. AM-S1* against plant and human pathogens. *Agricultural Chemistry and Environment* 2012; 1 (1): 141- 7.

(25) Kanini GS., Katsifas EA., Savvides AL., Karagouni AD. *Streptomyces rochei* ACTA1551, an indigenous greek isolate studied as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici. Hindawi Publishing Corporation* 2013; Article ID 387230 10 pages Available on internet at http://dx. doi. org/10. 1155/2013/387230.

(26) Saito A., Fujii T., Miyashita K. Chitinase system in *Streptomyces. Actinomycetol* 1990; 13 (1): 1- 10.

(27) Kawase T., Yokokawa S., Saito A., Fujii T., Nikaidou N., Miyashita., K. et al. Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *S. coelicolor A3(2). Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 2006; 70 (4): 988- 98.

(28) Yazici S., Yusuf Y., Isa K., Evaluation of bacteria for biological control of early blightdisease of tomato. *Biotechnology* 2011; 10 (9): 1573- 77.

(29) Watanabe T., Kanai R., Kawase T., Tanabe T., Mitsutomi M., Sakuda S., et al. Family 19 chitinases of *Streptomyces* species. *Microbiology* 1999; 145 (12): 3353- 63.

(30) Khatiri Y.,A study on isolated endophytic bacteria from Glycine sp. and their role on control of some plant pathogenic fungi. *Biological Journal of Microorganism*, 2013; 2 (5): 51- 60.

---

[1]- Actinomycetes
[2]- Soil borne
[3]- Chitin
[4]- Polysaccharide
[5]- N-Acetyl Glucose amin
[6]- Heidolph Persia
[7]- Vision Korea
[8]- Sartorius
[9]- Bender
[10]- Biometra
[11]- Metrohm
[12]- Tomy autoclave
[13]- Starch Casein Agar
[14]- International Streptomyces Project 2
[15]- Peptidoglycane
[16]- Chloroform Isoamyl
[17]- Isopropanol
[18]- Hoster
[19]- Ethidium Bromide
[20]- Alternaria alternata
[21]- Alternaria solani
[22]- Antibiogram
[23]- Dual Culture
[24]- Inhibition zone
[25]- Sodium hypochlorite
[26]- Potato Dextrose Agar
[27]- Potato Carrot Agar
[28]- Ghosta
[29]- Yazici

Isolation and molecular identification chitinase-producing Streptomyces strains and examination of their in-vitro antagonistic effects

Alireza Dehnad *
Assistant Professor of Microbial biotechnology, East Azerbaijan Agricultural Education Center, AREEO, Tabriz, Iran, dehnadar@yahoo.com & Adehnad@abrii.ac.ir
Ebrahim Esmaili
M.Sc. of Biotechnology, Zabol University, Iran, ab.esmaili60@gmail.com
Mahmood Solouki
Associate Professor of Plant Biotechnology, Zabol University, Biocenter, Iran, mahmood.solouki@gmail.com

Abstract

Introduction: The chemical fungicides are used widely in the world. To reduce the application of synthetic fungicides in treating plant diseases, biological methods are considered as an alternative way to control plant diseases. Many actinomycetes, particularly *Streptomyces* species are biological agents against a broad spectrum of fungal plant pathogens. The purpose of this study was using the kitinolitik actinomycetes isolated from soil of Eastern Azerbaijan province In order to produce biological pesticides.

Materials and methods: Soil samples were taken from different areas of Eastern Azerbaijan province. According to *Streptomyces* morphological features, single colonies were isolated. To identify the bacteria by molecular characteristic, the genomic DNA was extracted and then the sequences of *16S rDNA* were replicated. By using specific primers the bacterial isolates containing chitinase gene were screened. The isolates consisted Chitinase enzyme and were antagonistically cultured with *Alternaria* genus which is a fungal plant pathogen.

Results: Out of 60 soil collected samples, 31 *Streptomyces* bacterial isolates were separated. Four isolates showed positive results to selectivity action of the chitinase enzyme. Treatment of 3 bacterial isolates with 2 pathogenic fungi showed that AE09 is the most effective anti-fungal isolates.

Discussion and conclusion: Soils in Eastern Azerbaijan province are rich of *Streptomyces* bacteria which generate antifungal compounds. Obtaining the *Streptomyces* bacteria which have chitinase gene, can lead to identification of very effective strains as anti-fungal.

Key words: *Streptomyces*, Chitinase gene, *16S rDNA*, Biological control

* Corresponding author
Received: May 10, 2014 / **Accepted:** August 26, 2014